

### Extração de DNA Genômico de *Stylosanthes* spp.

Ana Lúcia Variani Bonato<sup>1</sup>  
Jaqueline Rosemeire Verzignassi<sup>2</sup>  
Rosângela Maria Simeão Resende<sup>3</sup>  
Celso Dornelas Fernandes<sup>4</sup>  
Gisele Olivas de C. Leguizamón<sup>5</sup>

#### Introdução

O Brasil Central, com nítida vocação para a pecuária, apresenta cerca de 100 milhões de hectares de pastagens cultivadas (Pizarro, 2001). Estas são compostas, principalmente, por gramíneas do gênero *Brachiaria*, especialmente *Brachiaria decumbens* e *B. brizantha*.

O uso de leguminosas forrageiras, em consorciação com gramíneas, constitui uma das melhores opções para a recuperação da qualidade dessas pastagens, das quais 80% apresenta algum nível de degradação (Macedo, 1995). Nesse particular, o gênero *Stylosanthes* que tem cerca de 15 espécies no Brasil, seu principal centro de diversidade, apresenta-se como um dos mais promissores para ser utilizado comercialmente em pastagens no país (Stace & Cameron, 1984; Karia & Andrade, 2000).

A leguminosa apresenta grande potencial forrageiro como fonte de proteína na alimentação animal e, em virtude da boa fixação biológica de nitrogênio e baixa exigência em

fertilidade, adapta-se muito bem aos solos pobres dos cerrados brasileiros, com benefícios ambientais.

Os programas de melhoramento de *Stylosanthes* spp. têm sido baseados em estudos de seleção de introduções visando a lançamentos de cultivares sob a forma de acessos únicos, ou de multilinhas, compostas pela mistura de vários acessos e seus recombinantes. Em 1993, a Embrapa Cerrados, em conjunto com a Embrapa Gado de Corte, liberou a cultivar Mineirão de *Stylosanthes guianensis* (Karia & Andrade, 2000) e em 2000, a Embrapa Gado de Corte lançou o Estilosantes Campo Grande (*Stylosanthes capitata* - *S. macrocephala*).

Com o lançamento dessas cultivares, o interesse dos pecuaristas por leguminosas forrageiras aumentou substancialmente. Cita-se, como exemplo, a área de 5.000 hectares de Estilosantes Campo Grande consorciada com braquiárias, no município de Chapadão do Sul, MS (Verzignassi & Fernandes, 2002), com ampliação, ainda em 2002, para 11.000 hectares.

<sup>1</sup> Enga.-Agra., Ph.D., CREA N° 78.233, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: analidia@cnpqg.embrapa.br

<sup>2</sup> Enga.-Agra., D.Sc., CREA/MS N° 7.594/D, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Capes/ProDoc

<sup>3</sup> Biol., D.Sc., CRBio 17.718-03D 3ª Região, Embrapa Gado de Corte. Correio eletrônico: rosangela@cnpqg.embrapa.br

Gado de Corte. Correio eletrônico: celsof@cnpqg.embrapa.br

eletrônico: gisele@cnpqg.embrapa.br

A coleção da Embrapa Gado de Corte, com mais de 1.000 acessos de *Stylosanthes* spp., continua sendo avaliada e selecionada com o objetivo de obter mais materiais promissores, visando ao uso em programas de melhoramento genético e liberação de novas cultivares.

As técnicas de genética molecular são consideradas ferramentas essenciais a esses programas de melhoramento e permitem estudos de: diversidade genética dentro e entre populações; taxas de alogamia das espécies envolvidas; investigação da suposta origem dos híbridos; mapas genéticos; identificação de espécies, cultivares e acessos; marcadores moleculares ligados à resistência a doenças e a outros aspectos agrônômicos; relação entre as espécies e gêneros visando à obtenção de híbridos, entre outros.

A eficiência das análises moleculares é essencialmente dependente da qualidade e quantidade do DNA extraído das plantas (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Em *Stylosanthes*, devido ao alto conteúdo de proteína, a coleta e o armazenamento do tecido vegetal, bem como o processo de extração e armazenamento do DNA extraído, requerem maiores cuidados comparativamente a outras espécies forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum* (Bonato et al., 2002).

O protocolo adotado pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte para a extração de DNA em *Stylosanthes* spp. tem sido baseado no método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), descrito por Saghai-Marooof et al. (1984) para plantas de cevada. No entanto, em função de características inerentes ao gênero, alguns ajustes foram necessários, criando-se um protocolo modificado, descrito neste Comunicado Técnico.

## Protocolo

A metodologia descrita nos passos seguintes é baseada no protocolo citado por Saghai-Marooof et al. (1984), com as alterações necessárias para a extração de DNA de plantas de *Stylosanthes* spp.

- Pesar, aproximadamente, 300 mg de tecido foliar fresco.
- Macerar com nitrogênio líquido, tomando-se cuidado para que o tecido não descongele.
- Adicionar às amostras 900 mL de tampão de extração CTAB (Tabela 1) pré-aquecido a 65°C e misturar bem.
- Incubar as amostras a 65°C em banho-maria por 60 a 90 minutos, invertendo os tubos, cuidadosamente, a cada 10 minutos.
- Retirar do banho-maria e deixar esfriar em temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar a 4.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente.

- Adicionar 225 mL de fenol e 225 mL de clorofórmio. Inverter, cuidadosamente, por 10 minutos.
- Centrifugar a 4.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Transferir o sobrenadante para novos tubos e adicionar 225 mL de fenol e 225 mL de clorofórmio. Inverter, cuidadosamente, por 10 minutos.
- Centrifugar a 4.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Transferir o sobrenadante para novos tubos e adicionar 450 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Inverter, cuidadosamente, por 10 minutos.
- Centrifugar a 4.500 g por 10 minutos à temperatura ambiente.
- Transferir o sobrenadante para novos tubos e adicionar 600 mL de isopropanol (-20°C). Misturar para precipitar o DNA, e
- Incubar a -20°C por 30 minutos.
- Centrifugar a 10.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Retirar o sobrenadante e deixar o *pellet*.
- Suspende em 400 mL de tampão TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0). Obs: Caso seja necessário, pode-se interromper o processo de extração nessa etapa, devendo-se armazenar a amostra a 4°C, durante a noite.
- Precipitar o DNA adicionando, inicialmente, 20 mL de NaCl 5M (para 400 mL) e, em seguida, 800 mL de etanol absoluto.
- Inverter os tubos, cuidadosamente, até precipitar o DNA.
- Centrifugar a 10.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente.
- Lavar o *pellet* com, aproximadamente, 400 mL de etanol 70% (-20°C).
- Descartar o etanol e deixar secar à temperatura ambiente.
- Suspende o *pellet* em 50 ou 100 mL de TE.
- Adicionar 6 mL de RNase (10 mg/mL). Misturar e incubar a 37°C por 30 minutos.
- Armazenar as amostras a -20°C.

## Considerações sobre os procedimentos

O primeiro passo a ser considerado na extração de DNA de *Stylosanthes* spp. é a coleta das amostras do tecido vegetal. Recomenda-se coletar tecido foliar novo, no qual ocorre a fase ativa de crescimento das plantas. Isto foi observado ser particularmente válido para *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala*, pois a coleta de tecido foliar adulto, tendendo à senescência, resultou em oxidação e degradação do DNA, sugerindo contaminação com polifenóis, que se oxidam em compostos quinônicos ou contaminação com DNases endógenas.

**Tabela 1.** Tampão de extração CTAB.

<b>Componentes</b>	<b>Volume final (10 mL)</b>
CTAB 5%	4,0 mL
NaCl 5 M	2,8 mL
Tris-HCl 1M pH 8,0	1,0 mL
EDTA 0,5 M	0,4 mL
Água destilada	1,6 mL
2-mercaptoetanol	0,04 mL
Polivinilpirrolidone (PVP)	0,1 g

As amostras devem ser processadas logo após a coleta do material, devendo ser mantidas no gelo, ou após um período de alguns dias, se mantidas congeladas a -20°C.

Na maceração mecânica, em que há o rompimento das paredes e membranas celulares do tecido, deve-se tomar o cuidado para se manter as folhas congeladas pela adição de nitrogênio líquido. Em etapa seguinte, o tecido macerado é suspenso com tampão de extração CTAB, contendo o detergente catiônico CTAB, para que as membranas proteicas sejam solubilizadas. Para a solubilização e ação do CTAB é adicionada uma concentração de 1,4M NaCl e para manutenção do pH constante é utilizado um sistema Tris-HCl pH 8,0. Os outros componentes desse tampão visam proteger o DNA da ação de enzimas nativas ou compostos secundários liberados a partir do rompimento das células. O EDTA (etilenodiaminotetracetato), por exemplo, promove a quelatação de cátions divalentes, tais como  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  e o PVP (polivinilpirrolidone) tem efeito antioxidante. O produto 2-mercaptoetanol é agente redutor que desnatura proteínas como peroxidases e polifenoloxidasas. Para *Stylosanthes capitata* e *S. macrocephala* foi necessário utilizar 0,4% de 2-mercaptoetanol para a sua efetiva ação.

Após o processamento com o tampão de extração, o material é submetido à desproteinização, por meio de extração com os solventes orgânicos fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação para a separação da fase orgânica da fase aquosa. Esta terceira etapa é repetida para purificar o DNA dos contaminantes, diferentemente do protocolo original, que propõe esta purificação apenas uma vez e não utiliza fenol. Posteriormente, com a adição de um álcool e na presença de um sal (NaCl) o DNA é rapidamente precipitado e, posteriormente, sedimentado por centrifugação. Segue-se a lavagem do DNA com etanol 70% e a secagem à temperatura ambiente.

Posteriormente, o DNA é suspenso em tampão TE (Tris-EDTA) e é tratado com RNase para, em seguida, ficar armazenado na forma concentrada. Comparativamente à

técnica estabelecida por Bonato et al. (2002), no que se refere à extração de DNA de *Panicum*, foi necessário elevar ao dobro a dose de RNase para a remoção de RNA dessa solução com o DNA. A diluição, posterior, para uma solução de trabalho é feita com água miliQ.

Após a extração do DNA, procedem-se as devidas quantificações e reações para estudos genéticos através de marcadores moleculares, como RAPD, AFLP, microssatélites, entre outros.

As alterações no protocolo básico citado por Saghai-Marrof et al. (1984) para cevada, possibilitaram a extração de DNA genômico de boa qualidade a partir de plantas de *Stylosanthes* spp. O DNA extraído apresentou-se íntegro e a metodologia descrita neste Comunicado Técnico apresentou-se passível de reprodução em laboratórios pertinentes.

## Referências bibliográficas

- BONATO, A. L. V.; VALLE, C. B. do; JANK, L.; RESENDE, R. M. S.; LEGUIZAMON, G. O. C. **Extração de DNA genômico de *Brachiaria* e *Panicum maximum***. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 5 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 79).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P. **Uso de *Stylosanthes* em pastagens no Brasil**. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS: Temas em evidência. Anais... Lavras. 2000. Lavras: UFLA. 2000
- MACEDO, M. C. M. **Pastagens no ecossistema Cerrados: pesquisa para o desenvolvimento sustentável**. In: SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSISTEMAS BRASILEIROS, 1995, Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 1995. p. 28-62.
- PIZARRO, E. A. **Novel grasses and legumes germplasm: advances and perspectives for tropical zones**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 93-100.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SLOMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. **Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics**. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and evolution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. (Ed.) **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Australia: Academic Press, 1984. p. 49-72.

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Estilosantes Campo Grande: situação atual e perspectivas**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 3 p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 70).

#### **Comunicado Técnico, 78**

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
Embrapa Gado de Corte  
Endereço: Rodovia BR 262, km 4, Caixa Postal 154  
79002-970 Campo Grande, MS  
Fone: (67) 368 2083  
Fax: (67) 368 2180  
E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2002): 500 exemplares

#### **Comitê de publicações**

Presidente: Cecília Borges do Valle  
Secretário-Executivo: Liana Jané  
Membros: Antonio do Nascimento Rosa, Arnaldo Pott,  
Ecila Caroline N. Z. Lima, Ezequiel R. do Valle, José  
Raul Valério, Maria Antonia M. de U. Cintra,  
Rosângela Maria S. Resende, Tâmisson W. de Souza

#### **Expediente**

Supervisor editorial: Ecila Caroline N. Z. Lima  
Revisão de texto: Sylvia Odinei Casco  
Editoração eletrônica: Ecila Caroline N. Z. Lima